

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-165184

(43)Date of publication of application : 23.06.1998

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C12P 21/08

//(C12P 21/08

C12R 1:91)

(21)Application number : 08-335743 (71)Applicant : TOSOH CORP

(22)Date of filing : 16.12.1996 (72)Inventor : MIYATA KENJI

ANZAI MASAYUKI

SHIGETA KATSUMI

(54) ANTIBODY, GENE AND PRODUCTION OF CHIMERA ANTIBODY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new gene coding H chain V region or L chain V region of an antibody capable of recognizing a structure containing sialic acid and fucose, and capable of recognizing a cancer-concerning antigen, useful for production, etc., of an antibody useful for a serodiagnosis of the cancer, etc.

SOLUTION: This gene is a new gene coding H chain V region or L chain V region of an antibody capable of recognizing a structure containing sialic acid and fucose, capable of recognizing a cancer concerning antigen and useful for production, etc., of an antibody recognizing a structure containing sialic acid and fucose, an application, etc., of which to a serodiagnosis of the cancer are expected. The gene is obtained by producing hybridoma 2D3 by using an acidic glycolipid extracted from meconium as an immunogen, extracting mRNA from the cells by a conventional method, converting the mRNA to a cDNA, performing a polymerase chain reaction(PCR) by using the obtained cDNA as a template and further using a primer, and amplifying the DNA fragment coding H chain V region or L chain V region of the

antibody.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's
decision of rejection]

[Kind of final disposal of application
other than the examiner's decision of
rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The gene characterized by carrying out the code of the H chain V field or L chain V field of an antibody which recognizes the structure containing a sialic acid and fucose.

[Claim 2] The gene to which structure containing a sialic acid and fucose is characterized by existing in an acid glycolipid in claim 1.

[Claim 3] The gene characterized by extracting an acid glycolipid from a meconium in claim 2.

[Claim 4] claims 1-3 — the gene characterized by carrying out the code of the array number 1 or the amino acid sequence of 2 in one of terms.

[Claim 5] claims 1-4 — the gene characterized by what is expressed with the array number 1 or the base sequence of 2 in one of terms.

[Claim 6] The H chain V field or L chain V field of an antibody characterized by what is expressed with the array number 1 or the amino acid sequence of 2.

[Claim 7] claims 1-5 — the process of the chimeric antibody characterized by inserting a gene given in one of terms in a chimeric antibody manifestation plasmid, cultivating the host who did the transformation by this plasmid, and collecting the produced antibodies.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. *** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]**[0001]**

[Field of the Invention] This invention relates to the gene of the antibody which recognizes the structure containing a sialic acid and fucose etc.

[0002]

[Description of the Prior Art] The antibody which recognizes the specific sugar chain which a cancer cell produces is used for the serodiagnosis of cancer (*** ratios, newest inspection two volumes, p1984 [61 or]). cancer -- immunity of the antibody which recognizes a specific sugar chain is carried out to a mouse etc. by using a cancer cell (Koprowski et al., Somatic Cell Genet, five volumes, p1979 [957 or]), organization extract glycoconjugate (JP,2-104294,A), or a synthetic sugar chain (JP,3-280894,A) as an antigen, and it is produced by producing and monoclonal-izing a hybridoma. Thus, the monoclonal antibody obtained is characterized based on affinity with an antigen, and compatibility.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Structure is similar to the sugar chain discovered on the cancer cell film, and the sugar chain which is discovered by the alimentary canal epithelial cell at a fetal period, and is discharged in a meconium is said to be the structure containing a sialic acid and fucose. Therefore, it is expected that the antibody which recognizes the structure containing a sialic acid and fucose will recognize the antigen of cancer relevance. Moreover, since the antigen with the sugar chain containing a sialic acid cannot disappear easily out of blood, as for the antibody which recognizes it, the application to serodiagnosis is expected.

[0004] Therefore, this invention aims at offering the gene which carries out the code of the antibody which recognizes the structure containing a sialic acid and fucose.

[0005]

[Means for Solving the Problem] this invention persons reached this invention, as a result of repeating examination wholeheartedly in view of said technical problem about the gene which carries out the code of the V field of the antibody which recognizes the structure containing a sialic acid and fucose.

[0006] That is, this invention is a gene characterized by carrying out the code of the H chain V field or L chain V field of an antibody which recognizes the structure containing a sialic acid and fucose. Moreover, this invention is the H chain V field or L chain V field of an antibody characterized by what is expressed with the array number 1 or the amino acid sequence of 2. Furthermore, this invention is the process of the chimeric antibody which inserts an above-mentioned gene in a chimeric antibody manifestation plasmid, cultivates the host who did the transformation by this plasmid, and is characterized by collecting the produced antibodies. Hereafter, this invention is further explained to a detail.

[0007] The gene by this invention is an object which carries out the code of the H chain V field or L chain V field of an antibody which recognizes the structure containing a sialic acid and fucose. As a sugar chain antigen containing a sialic acid and fucose, although for example, a sialyl-Lewis m antigen, a sialyl-Lewis x antigen, etc. are raised, it is not limited to these. These can be extracted from the flume crack and meconium by which structure is similar to the sugar chain discovered on the cancer cell film. There is especially no limitation in the approach of extracting an acid glycolipid from a meconium, and it should just adopt suitably the extract by various solvents, purification by the column chromatography, etc. as it.

[0008] There is no limitation especially as an antibody which recognizes the structure containing such a sialic acid and fucose, and it can prepare with a conventional method. If an example is given, the antibody which hybridoma 2D3 of a publication produces to JP,2-104294,A can be illustrated.

[0009] Although there is especially no limitation as a gene which carries out the code of the H chain V field or L chain V field of such an antibody, after extracting mRNA from the hybridoma which produces such an antibody, for example and changing into cDNA with a conventional method, it can prepare by amplifying the DNA by PCR etc. For example, as a gene sequence of the H chain V field of the antibody which hybridoma 2D3 produces, or an L chain V field, the base sequence expressed with the array numbers 1 or 2 can be illustrated. Moreover, as the H chain V field or L chain V field of the antibody which can presume the amino acid sequence of the H chain V field of an antibody, or an L chain V field from this base sequence, for example, hybridoma 2D3 produces, the amino acid sequence expressed with the array numbers 1 or 2 can be illustrated. The nucleic-acid array which carries out the code of the amino acid sequence furthermore expressed with the array

numbers 1 or 2 is also included in this invention.

[0010] A chimeric antibody can be manufactured using the gene of such this invention. For example, what is necessary is to insert the gene of this invention in the plasmid which may discover a chimeric antibody, to carry out the transformation of the host by this plasmid, to cultivate the host and just to collect the produced chimeric antibodies. About these concrete conditions, there is especially no limitation and it can be performed with a conventional method.

[0011]

[Example] Although an example is hereafter shown in order to explain this invention to a detail further, this invention is not limited to these examples.

[0012] Example 1 According to isolation JP,2-104294,A of 2D3 cell antibody gene, hybridoma 2D3 was produced by making into immunogen the acid glycolipid extracted from the meconium. RPMI With the mRNA extract kit (Pharmacia manufacture), mRNA of 2D3 cell was prepared and it changed into cDNA from 1x10⁶ hybridoma 2D3 cells cultivated by 1640 (Gibco make) according to the conventional method.

[0013] Next, this cDNA was used as mold, PORIME ball-race chain reaction (PCR) was performed using the base sequence of the oligonucleotide primer VH1BACK; array number 3 and the VHFOR2SAL1; array number 4, the DNA fragment which carries out the code of the V field of the H chain of an antibody was amplified, and it inserted in the plasmid pUC19 digested with the restriction enzyme SmaI. On the other hand, this cDNA was used as mold, PCR was performed using the base sequence of the oligonucleotide primer Vkappa1BACK; array number 5 and the Vkappa1FOR; array number 6, the DNA fragment which carries out the code of the V field of the L chain of an antibody was amplified, and it inserted in the plasmid pUC19 digested with the restriction enzyme SmaI.

[0014] Example 2 The base sequence which carries out the code of V field of the H chain which carried out cloning, and the V field of an L chain was determined as the plasmid pUC19 produced in the decision example 1 of the base sequence of 2D3 cell antibody gene using fluorescence DNA sequencer Model373A (Applied Biosystem) and a Taq die terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystem). The amino acid sequence presumed from the base sequence and the base sequence concerned of V fields each of an H chain and an L chain is shown in the array number 1 and the array number 2, respectively.

[0015] Example 3 It inserted in the chimeric antibody H chain manifestation plasmid pEdHCG1 (refer to JP,8-51995,A) which digested pUC19 which carried out cloning of the V field of the H chain produced in the production example 1 of a mouse Homo sapiens chimeric antibody with restriction enzymes PstI and SalI, and digested the DNA fragment after digestion by

restriction enzyme Sse8387I and SalI, and pEdHCG1-2D3 was built. It inserted in chimeric antibody L chain manifestation plasmid pEdHCkappa (refer to JP,8-51995,A) which digested pUC19 which carried out cloning of the V field of the L chain produced in the example 1 with restriction enzymes PvuII and BglII, and digested the DNA fragment after digestion with restriction enzymes PvuII and BclI, and pEdHCkappa-2D3 was built. In addition, the plasmid used here is characterized by producing a mouse Homo sapiens chimeric antibody in a culture supernatant.

[0016] The transient manifestation in a COS cell was checked in the following procedures. pEdHCG1-2D3 and pEdHCkappa-2D3 with the calcium phosphate method, and culture supernatants were collected three days after. [the COS cell] The culture supernatant which performed same actuation without DNA and collected it was used as contrast. The chimera antibody titer in the collected culture supernatant was measured.

[0017] Measurement of the chimera antibody titer in a culture supernatant was carried out as the following, and was performed. 96 hole immuno plate which solid-phase-ized anti-Homo sapiens IgG1 antibody was blocked by the phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5%BSA. 100micro of culture supernatants I was added after washing a plate by PBS, and it put on the room temperature gently for 2 hours. The horseradish peroxidase (HRP) indicator anti-Homo sapiens Igkappa antibody after washing a plate was added by PBS, and it put at the room temperature for 2 hours. The commercial color reagent (ABTS, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd. make) was added after washing a plate by PBS, and extent of coloring was measured with the commercial measuring device (microtiter plate reader MPR4i, TOSOH CORP. make). Consequently, it turned out that the about 40 ng(s)/ml chimeric antibody is produced in a culture supernatant.

[0018] Example 4 It checked recognizing the structure where the COS cell culture supernatant liquid [KOTORANSUFEKUSHON / supernatant liquid] which was collected in the reactant example 3 to a sialyl-Lewis m antigen contains a sialic acid and fucose by the following actuation. The COS cell culture supernatant liquid which contains the culture supernatant and anti-T3 chimeric antibody of a COS cell which have not introduced DNA used in the example 3 as a contrast sample about 60 ng(s)/ml was used.

[0019] 96 hole immuno plate which solid-phase-ized the sialyl-Lewis m antigen was blocked by PBS which contains BSA 0.5%. 100micro of culture supernatants I after washing was added for the plate by PBS, and it put on the room temperature gently for 2 hours. The HRP indicator anti-Homo sapiens Igkappa antibody after washing a plate was added by PBS, and it put at the room temperature for 2 hours. The washing back ABTS was added for the plate by PBS, and extent of coloring was measured by microtiter-pre-Tori-DA-MPR4i. A result is shown in drawing 1 . an axis of

ordinate -- the absorbance in 415nm -- an axis of abscissa -- the logarithm of the concentration (ng/well) of a sialyl-Lewis m antigen -- a value is shown, respectively. A black dot shows a chimeric antibody among drawing, and a white round head shows contrast. Consequently, this chimeric antibody was combined with the sialyl-Lewis m antigen containing a sialic acid and fucose.

[0020]

[Effect of the Invention] It is possible to produce the antibody which recognizes the structure containing a sialic acid and fucose in large quantities by inserting in a chimeric antibody manifestation plasmid the gene which carries out the code of V field of the H chain of an antibody which recognizes the structure containing the sialic acid and fucose which are offered by this invention, and the V field of an L chain, and cultivating the host who did the transformation by this plasmid.

[0021]

[Layout Table]

array number: -- die-length [of one array]: -- mold [of 345 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- double strand topology: -- class [of straight chain-like array]: -- cDNA to The mRNA origin cellular in: -- hybridoma 2D3 array GTC CAG CTG CAG GAG TCT GGA GGA GGC TTG GTG CAA CCT GGA GGA 45 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15 TCC ATG AAA CTC TCT TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACT TTT AGT GAC 90 Ser MetLys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe ThrPhe SerAsp 20 25 30 GCC TGG ATG GAC TGG GTC CGC CAG TCTCCA GAG AAG GGG CTT GAG 135 Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu 35 40 45 TGG GTT GCT GAAATT TAT AAC AAA GCT GGT AAT CAT GCA ACA TTC 180 Trp Val Ala Glu Ile Tyr Asn Lys Ala Gly Asn HisAla ThrPhe 50 55 60 TAT GCT GAG TCT GGG AAA GGG AGG TTC ACC ATC TCA AGA GAT GAT 225 Tyr Ala Glu Ser Gly Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp 65 70 75 TCC AAA AGT AGTGTC TAC CTG CAA ATG AAC AGC TTG AGA GCT GAA 270 Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu 80 85 90 GAC GCT GGC ATTTAT TAC TGT ACC TCC CGG TTT GCT TAC TGG GGC 315 Asp Ala Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Ser Arg PheAla TyrTrp Gly 95 100 105 CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCG 345 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala 110 115.

[0022] array number: -- die-length [of two arrays]: -- mold [of 318 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- double strand topology: -- class [of straight chain-like array]: -- cDNA to The mRNA origin cellular in: -- hybridoma 2D3 Array GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA TCT TCC ATG TAT GCA TCT CTA 45 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu 1 5 10 15 GGA GAG AGA GTC ACT ATC ACT TGC AAG

GCG AGT CAG GAC ATT AAT 90 Gly GluArg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser GlnAsp IleAsn 20 25 30 AGG TAT TTA AGC TGG TTC CAG CATAAA CCA GGG AAA TCT CCT AAG 135 Ser Tyr Leu Ser Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Lys SerPro Lys 35 40 45 ACC CTG ATC TATCGT GCA AAC AGA TTG GTA GAT GGG GTC CCA TCA 180 Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp GlyVal ProSer 50 55 60 AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG CAA GAT TAT TCT CTCACC ATC 225 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp TyrSer LeuThr Ile 65 70 75 AGC AGC CTG GAGTAT GAA GAT ATG GGA ATT TAT TAC TGT CTA CAG 270 Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Met Gly Ile Tyr TyrCys LeuGln 80 85 90 TAT GAT GAG TCTCCT CGG ACG TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAG 315 Tyr Asp Glu Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gly Thr LysLeu Glu 95 100 105 ATC 318 Ile 106.

[0023] array number: -- die-length [of three arrays]: -- mold [of 22 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- single-strand topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array Synthetic DNA Array AGGTSMARCT GCAGSAGTCW GG 22.

[0024] array number: -- die-length [of four arrays]: -- mold [of 46 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- single-strand topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array Synthetic DNA Array GGGGGTCGAC GCTGAGGAGA CGGTGACCGT GGTCCCTTGG CCCCAC 46.

[0025] array number: -- die-length [of five arrays]: -- mold [of 24 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- single-strand topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array Synthetic DNA Array GACATTCAAGC TGACCCAGTC TCCA 24.

[0026] array number: -- die-length [of six arrays]: -- mold [of 22 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- single-strand topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array Synthetic DNA Array GTTAGATCTC CAGCTTGGTC CC 22.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. *** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is drawing showing the reactivity of the chimeric antibody and sialyl-Lewis m antigen which were performed in the example 4.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-165184

(43)公開日 平成10年(1998)6月23日

(51)Int.Cl.⁶
C 12 N 15/09
C 12 P 21/08
// (C 12 P 21/08
C 12 R 1:91)

識別記号
ZNA

F I
C 12 N 15/00
C 12 P 21/08

(21)出願番号 特願平8-335743
(22)出願日 平成8年(1996)12月16日

審査請求 未請求 請求項の数 7 OL (全 5 頁)

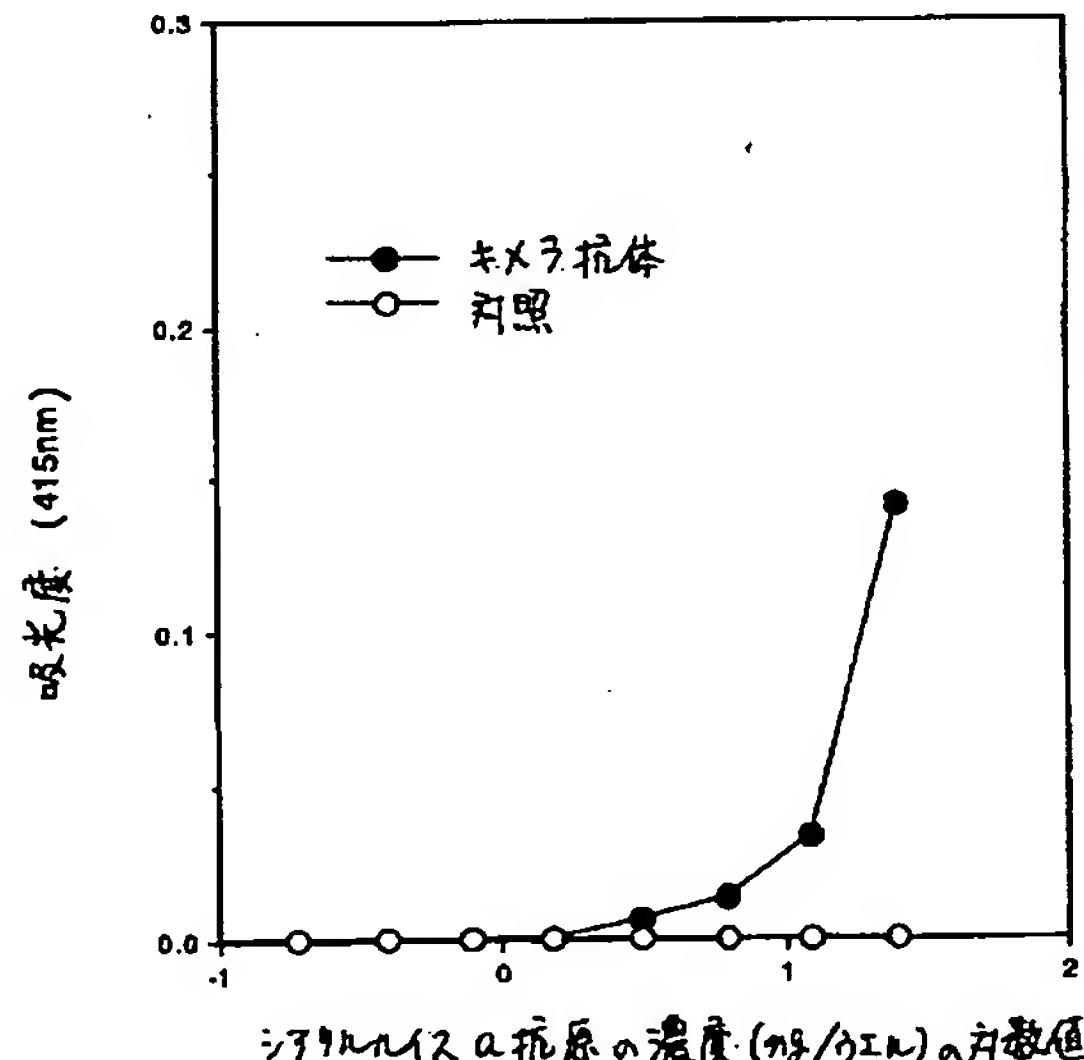
(71)出願人 000003300
東ソー株式会社
山口県新南陽市開成町4560番地
(72)発明者 宮田 堅司
神奈川県横浜市青葉区つつじが丘2-2-
204
(72)発明者 安斎 政幸
神奈川県座間市相武台2-119-411
(72)発明者 繁田 勝美
神奈川県横浜市戸塚区戸塚町4501 A-
403

(54)【発明の名称】 抗体、遺伝子及びキメラ抗体の製法

(57)【要約】

【課題】シアル酸およびフコースを含む構造を認識する抗体をコードする遺伝子などを提供する。

【解決手段】シアル酸及びフコースを含む構造を認識する抗体のH鎖V領域またはL鎖V領域をコードする遺伝子を、キメラ抗体発現プラスミドに挿入し、該プラスミドで形質転換した宿主を培養し、生産された抗体を回収することにより、キメラ抗体を製造する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】シアル酸及びフコースを含む構造を認識する抗体のH鎖V領域またはL鎖V領域をコードすることを特徴とする遺伝子。

【請求項2】請求項1において、シアル酸及びフコースを含む構造が、酸性糖脂質中に存在することを特徴とする遺伝子。

【請求項3】請求項2において、酸性糖脂質が胎便より抽出されることを特徴とする遺伝子。

【請求項4】請求項1～3いずれかの項において、配列番号1又は2のアミノ酸配列をコードすることを特徴とする遺伝子。

【請求項5】請求項1～4いずれかの項において、配列番号1又は2の塩基配列で表されることを特徴とする遺伝子。

【請求項6】配列番号1又は2のアミノ酸配列で表されることを特徴とする抗体のH鎖V領域またはL鎖V領域。

【請求項7】請求項1～5いずれかの項に記載の遺伝子をキメラ抗体発現プラスミドに挿入し、該プラスミドで形質転換した宿主を培養し、生産された抗体を回収することを特徴とするキメラ抗体の製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、シアル酸及びフコースを含む構造を認識する抗体の遺伝子等に関するものである。

【0002】

【従来の技術】癌細胞が産生する特異的な糖鎖を認識する抗体は、癌の血清診断に利用されている（屋嘉比ら、最新検査 2巻、p61、1984年）。癌特異的な糖鎖を認識する抗体は、癌細胞（Koprowskiら、Somatic Cell Genet. 5巻、p957、1979年）、組織抽出複合糖質（特開平2-104294号）または合成糖鎖（特開平3-280894号）を抗原としてマウス等に免疫し、ハイブリドーマを作製し、モノクローナル化することにより作製される。この様にして得られるモノクローナル抗体は抗原との結合性、親和性に基づいて特徴づけられる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】胎児期に消化管上皮細胞で発現し胎便中に排出される糖鎖は、癌細胞膜上に発現される糖鎖に構造が類似しており、シアル酸およびフコースを含む構造であるといわれている。したがって、シアル酸およびフコースを含む構造を認識する抗体は、癌関連性の抗原を認識することが期待される。又シアル酸を含む糖鎖を持つ抗原は血中から消失しにくいので、それを認識する抗体は、血清診断への応用が期待される。

【0004】従って本発明は、シアル酸およびフコース

を含む構造を認識する抗体をコードする遺伝子などを提供することを目的とするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題に鑑みて、シアル酸およびフコースを含む構造を認識する抗体のV領域をコードする遺伝子について鋭意検討を重ねた結果、本発明に到達した。

【0006】即ち本発明は、シアル酸及びフコースを含む構造を認識する抗体のH鎖V領域またはL鎖V領域をコードすることを特徴とする遺伝子である。また本発明は、配列番号1又は2のアミノ酸配列で表されることを特徴とする抗体のH鎖V領域またはL鎖V領域である。さらに本発明は、上述の遺伝子をキメラ抗体発現プラスミドに挿入し、該プラスミドで形質転換した宿主を培養し、生産された抗体を回収することを特徴とするキメラ抗体の製法である。以下、本発明をさらに詳細に説明する。

【0007】本発明による遺伝子は、シアル酸及びフコースを含む構造を認識する抗体のH鎖V領域またはL鎖V領域をコードする物である。シアル酸及びフコースを含む糖鎖抗原として、例えばシアリルルイスa抗原、シアリルルイスx抗原などがあげられるが、これらに限定されるものではない。これらは、癌細胞膜上に発現される糖鎖に構造が類似しているといわれ、胎便より抽出することができる。酸性糖脂質を胎便より抽出する方法には特に限定ではなく、各種溶媒による抽出、カラムクロマトグラフィーによる精製などを適宜採用すればよい。

【0008】そのようなシアル酸及びフコースを含む構造を認識する抗体としては特に限定なく、常法により調製することができる。一例をあげると、特開平2-104294号公報に記載のハイブリドーマ2D3が产生する抗体を例示することができる。

【0009】このような抗体のH鎖V領域またはL鎖V領域をコードする遺伝子としては特に限定はないが、例えばそのような抗体を产生するハイブリドーマからmRNAを抽出し、常法によりcDNAに変換した後、PCRなどによりそのDNAを増幅することにより調製することができる。例えばハイブリドーマ2D3が产生する抗体のH鎖V領域またはL鎖V領域の遺伝子配列として、配列番号1または2で表される塩基配列を例示することができる。またこの塩基配列から抗体のH鎖V領域またはL鎖V領域のアミノ酸配列を推定することができ、例えば、ハイブリドーマ2D3が产生する抗体のH鎖V領域またはL鎖V領域としては、配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を例示することができる。さらに配列番号1または2で表されるアミノ酸配列をコードする核酸配列もまた本願の発明に含まれるものである。

【0010】このような本発明の遺伝子を用いて、キメラ抗体を製造することができる。例えば本発明の遺伝子

をキメラ抗体を発現しうるプラスミドに挿入し、該プラスミドで宿主を形質転換し、その宿主を培養し、生産されたキメラ抗体を回収すればよい。これらの具体的な条件については、特に限定ではなく、常法により行うことができる。

【0011】

【実施例】以下、本発明を更に詳細に説明するために実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0012】実施例1 2D3細胞抗体遺伝子の単離
特開平2-104294号公報に従い、胎便より抽出された酸性糖脂質を免疫原としてハイブリドーマ2D3を作製した。RPMI 1640(ギブコ製)で培養した 1×10^6 個のハイブリドーマ2D3細胞から、mRNA抽出キット(ファルマシア製)により、2D3細胞のmRNAを調製し、常法に従ってcDNAに変換した。

【0013】次に、このcDNAを鋳型とし、オリゴヌクレオチドプライマーVH1BACK:配列番号3、及びVHFOR2SAL1:配列番号4の塩基配列を用いてポリメーレースチェーンリアクション(PCR)を行い、抗体のH鎖のV領域をコードするDNA断片を増幅し、制限酵素SmaIで消化したプラスミドpUC19に挿入した。一方、同cDNAを鋳型とし、オリゴヌクレオチドプライマーV κ 1BACK:配列番号5、及びV κ 1FOR:配列番号6の塩基配列を用いてPCRを行って、抗体のL鎖のV領域をコードするDNA断片を増幅し、制限酵素SmaIで消化したプラスミドpUC19に挿入した。

【0014】実施例2 2D3細胞抗体遺伝子の塩基配列の決定

実施例1で作製したプラスミドpUC19にクローニングしたH鎖のV領域及びL鎖のV領域をコードする塩基配列を、蛍光DNAシーケンサModel373A(アプライドバイオシステム)、Taqダイターミネーターサイクルシークエンシングキット(アプライドバイオシステム)を使用し決定した。H鎖及びL鎖の各V領域の塩基配列及び当該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を、それぞれ配列番号1及び配列番号2に示す。

【0015】実施例3 マウス・ヒトキメラ抗体の作製
実施例1で作製したH鎖のV領域をクローニングしたpUC19を制限酵素PstI及びSalIで消化し、消化後のDNA断片を、制限酵素Sse8387I及びSalIで消化したキメラ抗体H鎖発現プラスミドpEdHCG1(特開平8-51995号公報参照)に挿入して、pEdHCG1-2D3を構築した。実施例1で作製したL鎖のV領域をクローニングしたpUC19を制限酵素PvuII及びBglIIで消化し、消化後のDNA断片を、制限酵素PvuII及びBclIで消化したキメラ抗体L鎖発現プラスミドpEdHC κ (特開平8-51995号公報参照)に挿入して、pEdHC κ

-2D3を構築した。尚ここで使用したプラスミドは、マウス・ヒトキメラ抗体を培養上清中に産生することを特徴とするものである。

【0016】COS細胞での一過性発現を以下の手順で確認した。pEdHCG1-2D3及びpEdHC κ -2D3を、リン酸カルシウム法によりCOS細胞にコトランクスフェクションし、3日後に培養上清を回収した。同様の操作をDNA無しで行い、回収した培養上清を対照として用いた。回収した培養上清中のキメラ抗体価を測定した。

【0017】培養上清中のキメラ抗体価の測定は以下の如くして行った。抗ヒトIgG1抗体を固相化した96穴イムノプレートを0.5%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)でブロッキングを行った。PBSでプレートを洗浄後、培養上清 $100\mu l$ を加え2時間室温に静置した。PBSでプレートを洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識抗ヒトIg κ 抗体を加え2時間室温で静置した。PBSでプレートを洗浄後、市販の発色試薬(ABTS、大日本製薬(株)製)を加え、発色の程度を市販の測定装置(マイクロタイターブレートリーダーMPR4i、東ソー(株)製)で測定した。その結果、培養上清中に約40ng/m1のキメラ抗体が産生されていることがわかった。

【0018】実施例4 シアリルルイスa抗原への反応性
実施例3で回収したコトランクスフェクションしたCOS細胞培養上清がシアル酸及びフコースを含む構造を認識することを以下の操作で確認した。対照試料としては、実施例3で用いたDNAを導入していないCOS細胞の培養上清及び抗T3キメラ抗体を約60ng/m1含むCOS細胞培養上清を用いた。

【0019】シアリルルイスa抗原を固相化した96穴イムノプレートを0.5%BSAを含むPBSでブロッキングを行った。PBSでプレートを洗浄後培養上清 $100\mu l$ を加え2時間室温に静置した。PBSでプレートを洗浄後、HRP標識抗ヒトIg κ 抗体を加え2時間室温で静置した。PBSでプレートを洗浄後ABTSを加え、発色の程度をマイクロタイターブレートリーダーMPR4iで測定した。結果を図1に示す。縦軸は415nmでの吸光度を、横軸はシアリルルイスa抗原の濃度(nmol/ウェル)の対数値をそれぞれ示す。図中、黒丸はキメラ抗体を、白丸は対照を示す。その結果、本キメラ抗体はシアル酸及びフコースを含むシアリルルイスa抗原に結合した。

【0020】

【発明の効果】本発明で提供される、シアル酸およびフコースを含む構造を認識する抗体のH鎖のV領域およびL鎖のV領域をコードする遺伝子を、キメラ抗体発現プラスミドに挿入し、該プラスミドで形質転換した宿主を培養することにより、シアル酸およびフコースを含む構

造を認識する抗体を大量に生産することが可能である。

* 配列の型：核酸

【0021】

鎖の数：二本鎖

【配列表】

トポロジー：直鎖状

配列番号：1

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の長さ：345

* 起源 セルライン：ハイブリドーマ2D3

配列

GTC CAG CTG CAG GAG TCT GGA CGA CCC TTG GTG CAA CCT GGA CGA	45
Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
TCC ATG AAA CTC TCT TGT GCT CCC TCT CGA TTC ACT TTT AGT GAC	90
Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp	
20 25 30	
GCC TGG ATG GAC TGG GTC CGC CAG TCT CCA GAG AAG CGG CTT GAG	135
Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu	
35 40 45	
TGG GTT CCT GAA ATT TAT AAC AAA GCT GGT AAT CAT CCA ACA TTC	180
Trp Val Ala Glu Ile Tyr Asn Lys Ala Gly Asn His Ala Thr Phe	
50 55 60	
TAT GCT GAG TCT GGG AAA CGG AGG TTC ACC ATC TCA AGA GAT GAT	225
Tyr Ala Glu Ser Gly Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp	
65 70 75	
TCC AAA AGT AGT GTC TAC CTG CAA ATG AAC AGC TTG AGA GCT GAA	270
Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu	
80 85 90	
GAC GCT GGC ATT TAT TAC TGT ACC TCC CCG TTT CCT TAC TCG GGC	315
Asp Ala Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Ser Arg Phe Ala Tyr Trp Gly	
95 100 105	
CAA CGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA CGG	345
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala	
110 115	

【0022】配列番号：2

* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：318

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の型：核酸

起源 セルライン：ハイブリドーマ2D3

鎖の数：二本鎖

*

配列

GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA TCT TCC ATG TAT GCA TCT CTA	45
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu	
1 5 10 15	
GGA GAG AGA GTC ACT ATC ACT TGC AAG CGG AGT CAG GAC ATT AAT	90
Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn	
20 25 30	
AGG TAT TTA ACC TGG TTC CAG CAT AAA CCA CGG AAA TCT CCT AAG	135
Ser Tyr Leu Ser Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys	
35 40 45	
ACC CTG ATC TAT CGT CGA AAC AGA TTG GTC GAT CGG GTC CCA TCA	180
Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser	
50 55 60	
AGG TTC AGT CGC AGT CGA TCT CGG CAA GAT TAT TCT CTC ACC ATC	225
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile	
65 70 75	

(5)

特開平10-165184

7

8

AGC AGC CTG GAG TAT GAA GAT ATG GGA ATT TAT TAC TGT CTA CAG 270
 Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln
 80 85 90
 TAT GAT GAG TCT CCT CCG ACG TTC GGT GGA CGG ACC AAG CTG GAG 315
 Tyr Asp Glu Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 95 100 105
 ATC 318
 Ile
 106 。

【0023】配列番号：3

10* 鎮の数：1本鎖

配列の長さ：22

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGGTSMARCT GCAGSAGTCW GG 22。

【0024】配列番号：4

※鎮の数：1本鎖

配列の長さ：46

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGGGGTCGAC GCTGAGGAGA CGGTGACCGT GGTCCCTTGG CCCCAC 46。

【0025】配列番号：5

20★ 鎮の数：1本鎖

配列の長さ：24

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GACATTCAAC TGACCCAGTC TCCA 24。

【0026】配列番号：6

☆鎮の数：1本鎖

配列の長さ：22

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTTAGATCTC CACCTTGGTC CC 22。

【図面の簡単な説明】

30◆ス a 抗原との反応性を示す図である。

【図1】実施例4で行った、キメラ抗体とシアリルルイ◆

【図1】

